



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, C12N 15/20	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/16784 (43) Date de publication internationale: 22 juin 1995 (22.06.95)
--	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: **PCT/FR94/01458**(22) Date de dépôt international: **13 décembre 1994 (13.12.94)**(30) Données relatives à la priorité:
93/14915 13 décembre 1993 (13.12.93) FR(71) Déposant (*pour tous les Etats désignés sauf US*): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*US seulement*): MEHTALI, Majid [FR/FR]; 10, boulevard Tauler, F-67000 Strasbourg (FR). LEISSNER, Philippe [FR/FR]; 16, rue des Balayeurs, F-67000 Strasbourg (FR).

(74) Mandataire: AHNER, Francis; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

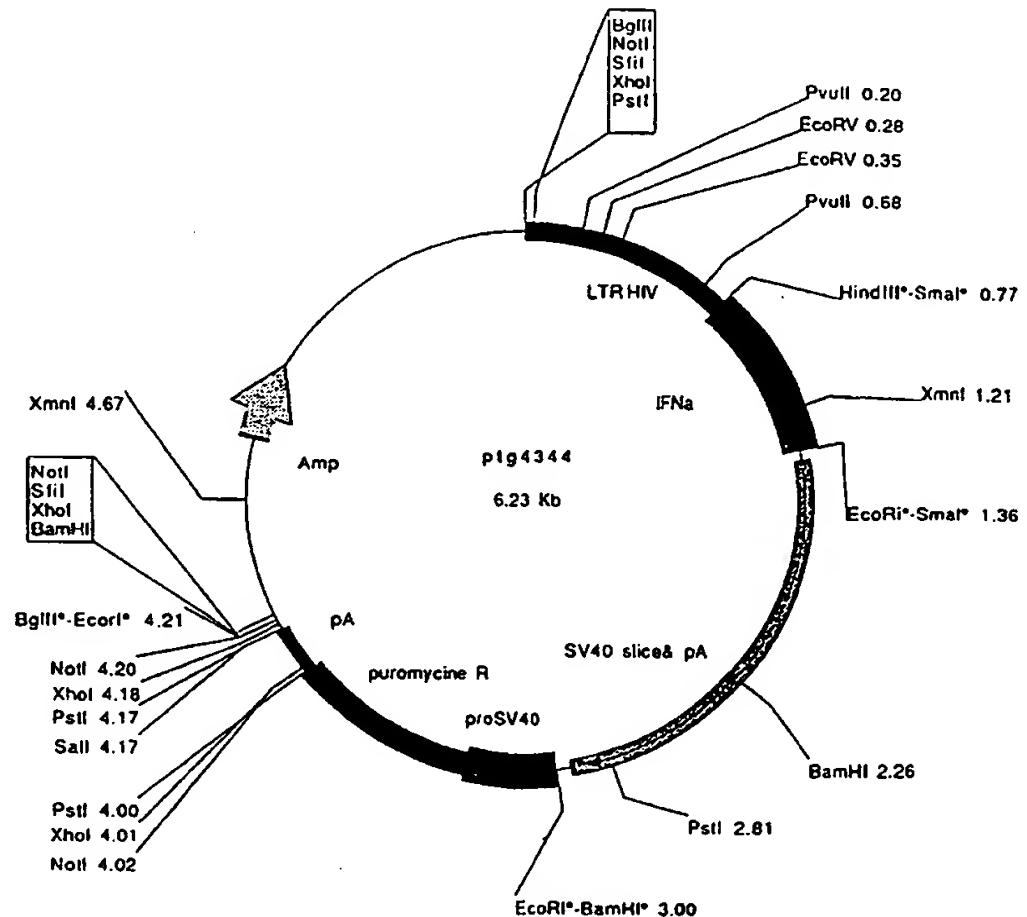
*Avec rapport de recherche internationale.
Avec revendications modifiées.*(54) Title: **HUMAN INTERFERON EXPRESSION VECTORS FOR TREATING AIDS**(54) Titre: **VECTEURS EXPRIMANT UN INTERFERON HUMAIN POUR LE TRAITEMENT DU SIDA**

(57) Abstract

A cassette for the expression of a human IFN gene placed under the control of HIV virus-inducible elements, a vector and a cell containing said cassette, therapeutical uses thereof, and a pharmaceutical composition for treating or preventing HIV-related infections, are disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne une cassette d'expression d'un gène IFN humain placé sous le contrôle d'éléments inducibles par le virus VIH. Elle couvre également un vecteur et une cellule comprenant ladite cassette ainsi que leur usage thérapeutique et une composition pharmaceutique pour le traitement ou la prévention des infections dues au VIH.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Subé
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

- 1 -

5

VECTEURS EXPRIMANT UN INTERFERON HUMAIN
POUR LE TRAITEMENT DU SIDA

10

La présente invention a pour objet une cassette comportant une séquence d'ADN codant pour un IFN humain dont l'expression est placée sous le contrôle 15 d'éléments régulables par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). La présente invention trouve une application intéressante dans le traitement ou la prévention des infections dues au VIH, notamment par thérapie génique.

Le VIH, agent étiologique du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), 20 infecte préférentiellement une sous-population de lymphocytes T, (T helper) responsables de l'amplification de la réponse immunitaire. En conséquence, la maladie évolue vers un déficit de l'immunité cellulaire, ce qui rend les individus malades particulièrement sensibles aux infections opportunistes. Jusqu'à présent, aucun traitement ne s'est révélé totalement satisfaisant malgré les multiples efforts 25 investis dans le développement de nouvelles molécules antivirales. Ces difficultés relèvent sans doute de la complexité particulière du virus VIH et de sa capacité à réprimer les systèmes de défenses immunitaires dans les cellules infectées.

Le VIH est un rétrovirus appartenant à la famille des lentivirus. Son matériel 30 génétique, constitué d'une molécule d'ARN, est encapsidé dans une capsidé de nature protéique, elle-même entourée d'une enveloppe virale. Outre les gènes structuraux (*gag*, *pol* et *env*) codant respectivement pour les protéines de la capsidé, la réverse-transcriptase et la protéine d'enveloppe, le génome du VIH comprend des gènes régulateurs qui commandent la réplication virale. Parmi ces

- 2 -

derniers, on peut citer les gènes *tat* et *rev* codant respectivement pour les protéines TAT et REV.

La protéine TAT a un rôle trans-activateur de l'expression de l'ensemble des gènes du VIH (Arya et al., 1985, *Science*, 229, 69-73). Il semble que TAT intervient aussi bien à un niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel. Elle interagit spécifiquement avec une courte séquence nucléotidique, désignée séquence TAR (pour Trans-activation Responsive Region), et localisée à l'extrémité 5' du génome et des transcrits viraux (position +1 à +80 ; +1 représentant le site d'initiation de la transcription) (Rosen et al., 1985, *Cell*, 41, 813-823).

La protéine REV favorise le transport vers le cytoplasme des ARN messagers (ARNm) codant pour les protéines de structure, pour y être traduits. De son côté, REV reconnaît spécifiquement une séquence RRE (pour REV Responsive Element) sur les ARNm. Celle-ci est localisée dans le gène *env* à proximité d'une autre séquence dite CRS (*Cis*-acting Repression Sequence), impliquée dans la rétention nucléaire des ARNm la portant. On suppose que la fixation de la protéine REV au niveau de sa séquence cible RRE a pour effet de contrebalancer l'effet inhibiteur de CRS sur le passage des grands ARNm viraux vers le cytoplasme.

Les séquences essentielles à la transcription des gènes viraux sont localisées aux deux extrémités du génome au niveau des LTRs (Long Terminal Repeat). Alors que le LTR 5' contient les séquences promotrices ainsi que les séquences TAR, le LTR 3' comprend les séquences impliquées dans la terminaison de la transcription.

D'une manière générale, lorsqu'une cellule est infectée par un virus, elle secrète des interférons (IFNs) en réponse à l'infection virale. Il s'agit d'un groupe de protéines exerçant des effets antiviraux et classifié en trois types α , β et γ . S'il existe plus d'une vingtaine de sous-types d'IFN α , les IFNs β et γ semblent uniques.

Paradoxalement, la synthèse des IFNs cellulaires (endogènes) est réprimée dans

- 3 -

les cellules infectées par le VIH. Cette répression empêche les cellules infectées par le VIH et les cellules avoisinantes de se défendre efficacement contre l'infection virale (Mark, 1992, AIDS Res. Hum. Retrovirus, 8, 199-207).

5 On a maintenant trouvé que l'introduction dans une cellule d'un gène codant pour un IFN humain (IFN exogène) dont l'expression est inducible par les protéines virales TAT et/ou REV, permet à la cellule génétiquement modifiée de se défendre dans un contexte infectieux. La présente invention a pour but de proposer différents vecteurs d'expression d'IFN humain régulables par les 10 protéines TAT et/ou REV du VIH. Cette approche met à profit les caractéristiques de réplication du virus VIH. Ainsi, en cas d'infection, la synthèse des IFNs cellulaires est inhibée mais la synthèse des IFNs exogènes est induite par le virus VIH lui-même, reconstituant ainsi un système de défense efficace à son encontre. L'usage d'un système d'expression inducible évite les problèmes de toxicité 15 cellulaire dans les cellules non infectées.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet une cassette d'expression comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour un IFN humain, placée 20 sous le contrôle des éléments capables d'assurer son expression dans une cellule de mammifère, caractérisée en ce que lesdits éléments sont régulables par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Une séquence d'ADN en usage dans la présente invention, peut coder pour un IFN humain de type α , β ou γ . Il peut s'agir des séquences divulguées dans l'art 25 antérieur et notamment dans Shaw et al. (1983, Nucleic Acid Res., 11, 555-573) pour l'IFN α , Higashi et al. (1983, J. Biol. Chem., 258, 9522-9529) pour l'IFN β et Gray et al. (1982, Nature, 295, 503-508) pour l'IFN γ . Ces séquences peuvent être isolées du gène ou de l'ADNc. Par séquence codant pour un IFN humain, on entend également désigner une séquence codant pour un analogue d'un IFN. Par 30 "analogue", on entend une molécule qui aurait une séquence en acides aminés légèrement différente d'un IFN natif mais qui conserverait l'essentiel de la fonction antivirale. En pratique, un tel analogue peut être obtenu par délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs acides aminés de la protéine native ou d'un fragment de celle-ci. L'homme du métier connaît les techniques qui

permettent d'effectuer ces modifications sans abolir la fonction biologique de la protéine.

Les éléments assurant l'expression d'une séquence d'ADN en usage dans le cadre 5 de la présente invention, sont les éléments conventionnels permettant la transcription de la séquence d'ADN en ARNm et la traduction de ce dernier en protéine, comme par exemple un promoteur et les codons d'initiation et de terminaison de la traduction. En outre, une cassette selon l'invention comprend des séquences régulables par le virus VIH.

10 D'une manière générale, on choisit un promoteur fonctionnel dans une cellule de mammifère et, de préférence, dans une cellule humaine. Il peut être issu d'un gène eucaryote quelconque ou d'un génome viral et être de nature ubiquitaire ou régulable, notamment en réponse à certains signaux cellulaires tissu-spécifiques 15 ou événement-spécifiques. Le choix du promoteur est très large et à la portée de l'homme de l'art. Cependant, on aura avantageusement recours au promoteur des gènes murins PGK (PhosphoGlycérate kinase) et β -actine ou au promoteur SV40 (Simian Virus 40).

20 Selon un mode particulièrement préféré, les séquences régulables par le VIH sont constituées d'une séquence de type TAR et/ou RRE/CRS. Une séquence de type TAR interagit avec la protéine TAT pour activer l'expression des gènes sous son contrôle. De son côté, une séquence de type RRE/CRS interagit avec la protéine REV pour favoriser le transport des ARNm dans le cytoplasme. On indique qu'elle 25 contient naturellement un site accepteur d'épissage. Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, ces séquences peuvent être légèrement différentes des séquences TAR et RRE/CRS natives (telle que publiées par Wain-Hobson et al., 1985, Cell, 40, 9-17), à condition toutefois d'être capables d'interagir avec les protéines TAT et REV virales.

30 S'agissant d'une séquence de type TAR, celle-ci est insérée en 3' du promoteur et, de manière tout à fait préférée, en position +1 (+1 étant le site d'initiation de la transcription). Dans ce contexte, il peut être avantageux d'avoir recours au LTR 5' du VIH qui comprend naturellement un promoteur fonctionnel dans les cellules

- 5 -

de mammifère suivi de la séquence TAR (en position +1 à +80). On peut également mettre en oeuvre une portion de celui-ci, qui comprend les séquences promotrices minimales (séquences Sp1, CAAT box et TATA box) et la séquence TAR. On désigne sous le nom de mini LTR un fragment de 200 pb correspondant à l'extrémité 3' du LTR et s'étendant des positions -120 à +80 du génome viral.

5 Selon une autre approche, une cassette selon l'invention comprend un promoteur conventionnel et une séquence de type RRE/CRS capable d'interagir avec la protéine virale REV du VIH. Ainsi, dans une cellule non infectée, les ARNm 10 seront bloqués dans le noyau sous l'action de CRS. Par contre, dès l'infection virale et la synthèse de REV, ils seront transportés dans le cytoplasme où ils seront traduits en IFN. De manière préférée, la séquence RRE/CRS est introduite en 3' de la séquence d'ADN codant pour un IFN.

15 Selon une autre variante, on peut soumettre l'expression d'une séquence d'ADN en usage dans la présente invention, à une double régulation par TAT et REV, ce qui permet de contourner les problèmes d'échappement de l'expression observés couramment avec certains promoteurs. Dans ce cas, une cassette d'expression selon l'invention, peut comprendre une séquence de type TAR et une séquence de type RRE/CRS; de sorte qu'en cas d'échappement de l'expression, les quelques 20 ARNm produits resteront bloqués dans le noyau. Seule la pénétration du VIH et la synthèse des protéines virales TAT et REV pourront déclencher la synthèse d'IFN.

25 Par ailleurs une cassette d'expression selon l'invention peut, en outre, contenir d'autres éléments contribuant à l'expression de la séquence d'ADN codant pour IFN, notamment, un intron, des signaux d'épissage adéquates et des éléments de terminaison de la transcription (signal de polyadénylation). Le choix et la localisation de ces éléments est à la portée de l'homme du métier.

30

A titre d'exemples préférés, on peut citer une cassette comprenant de 5' vers 3' :

(1) Le LTR 5' du VIH, une séquence d'ADN codant pour un IFN et le signal de polyadénylation de SV40 ;

- 6 -

(2) Le mini LTR du VIH, une séquence d'ADN codant pour un IFN et le signal de polyadénylation de SV40 ;

5 (3) Le promoteur PGK, la séquence TAR, une séquence d'ADN codant pour un IFN et le signal de polyadénylation de SV40 ;

(4) Le promoteur β -actine, la séquence TAR, une séquence d'ADN codant pour un IFN et le signal de polyadénylation de SV40 ;

10 (5) Le promoteur SV40, une séquence d'ADN codant pour un IFN, la séquence RRE/CRS et le signal de polyadénylation de SV40 ;

(6) Le LTR 5' du VIH, une séquence d'ADN codant pour un IFN, la séquence RRE/CRS et le signal de polyadénylation de SV40 ;

15 (7) Le mini LTR du VIH, une séquence d'ADN codant pour un IFN, la séquence RRE/CRS et le signal de polyadénylation de SV40 ; et.

20 (8) Le mini LTR du VIH, un site donneur d'épissage (du gène *gag* du VIH), une séquence d'ADN codant pour un IFN, la séquence RRE/CRS et le signal de polyadénylation de SV 40.

L'invention s'étend également aux vecteurs comprenant une cassette d'expression 25 selon l'invention. De tels vecteurs sont bien connus de l'homme de l'art, ainsi que les méthodes pour les construire et les propager. On aura avantageusement recours à des vecteurs viraux dérivés des rétrovirus, virus de l'herpès, adénovirus ou virus associés à l'adénovirus. Bien entendu on peut également employer des vecteurs synthétiques. Dans le cadre de l'invention, les vecteurs défectifs pour la 30 réplication, et notamment les vecteurs rétroviraux, sont particulièrement préférés. Selon un mode de réalisation avantageux, une cassette selon l'invention est positionnée en orientation réverse par rapport aux LTRs du vecteur rétroviral, afin de positionner les promoteurs en sens inverse pour éviter les interférences. Bien entendu, un vecteur selon l'invention peut, en outre, comprendre un gène codant

pour un marqueur de sélection, comme par exemple, les gènes néomycine et puromycine acétyl transférase conférant une résistance aux antibiotiques G418 et puromycine. L'invention couvre également les virus et particules de vecteur viral obtenus par transfection du vecteur selon l'invention, dans une lignée cellulaire 5 d'encapsidation, notamment amphotrope, produisant les protéines structurales du virus en cause.

L'invention a également trait à une cellule eucaryote comprenant, une cassette d'expression ou un vecteur selon l'invention. Ces derniers peuvent être introduits 10 soit *in vitro* dans une cellule prélevée du patient soit directement *in vivo*. La cellule est avantageusement une cellule humaine et, de manière préférée, une cellule de la lignée hématopoïétique (cellules souches ou lymphocytes primaires).

L'invention concerne également l'usage thérapeutique d'une cassette d'expression, 15 d'un vecteur ou d'une cellule selon l'invention, pour la fabrication d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement des infections virales et, en particulier, des infections dues au VIH.

L'invention s'adresse également à une composition pharmaceutique comprenant 20 à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique une cassette d'expression, un vecteur ou une cellule selon l'invention, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière 25 conventionnelle. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace d'un tel agent thérapeutique ou prophylactique à un support, un diluant ou un adjuvant acceptable. Elle peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine de l'art. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée après un certain délai d'intervalle. La quantité à 30 administrer sera choisie en fonction de différents critères, en particulier la voie d'administration, le patient, l'état d'évolution de la maladie et la durée du traitement. A titre indicatif, une composition pharmaceutique selon l'invention contient de 10^3 à 10^{14} ufp (unité formant des plages), avantageusement de 10^5 à 10^{13} ufp, de préférence de 10^6 à 10^{12} ufp et, de manière tout à fait préférée, de 10^7

à 10^{10} ufp de particules de vecteur viral.

Par ailleurs, l'invention concerne une méthode de traitement des infections virales et, notamment à VIH, selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace, d'une cassette d'expression, d'un vecteur ou d'une cellule selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement. Selon un premier protocole thérapeutique, on peut les administrer directement *in vivo*, par exemple par voie intraveineuse. On préférera adopter un protocole de thérapie génique somatique qui consiste à prélever des cellules souches de moelle osseuse ou des lymphocytes du sang périphérique d'un patient, de les transfacter avec un vecteur selon l'invention, de les cultiver *in vitro* selon les techniques de l'art et de les administrer au patient. A titre indicatif, il peut être avantageux d'employer 10^6 à 10^{10} cellules par kg, de préférence 10^7 à 10^9 et, de manière préférée 5×10^7 à 5×10^8 .

15 Naturellement, ce protocole peut être sujet à de nombreuses variantes. En particulier, il peut être avantageux de combiner au moins deux cassettes, vecteurs ou cellules selon l'invention permettant l'expression d'un IFN de types différents, par exemple un IFN α et un IFN β .

20 L'invention est illustrée ci-après par référence aux figures suivantes.

La figure 1 schématise le vecteur pTG4313 permettant l'expression d'une séquence d'ADN codant pour l'IFN α sous le contrôle du LTR du VIH.

25 La figure 2 représente le vecteur pTG4344 co-exprimant le gène IFN α et le gène de sélection puromycine.

La figure 3 schématise le vecteur rétroviral pTG4379 pour le transfert d'un gène IFN et son expression inductible par TAT.

30 La figure 4 montre l'évolution de l'infection dans des cellules U937 infectées par le VIH III B et transfectées par les vecteurs d'expression de l'IFN α (□), β (♦) et γ (◊), comparée au témoin cellules non transfectées (■).

- 9 -

La figure 5 illustre le vecteur rétroviral pTG6324 comprenant les cassettes d'expression de l'IFN α (sous le contrôle du mini LTR du VIH) et du gène de sélection *neo* (sous le contrôle du LTR 5' rétroviral).

5 La figure 6 illustre l'évolution de l'infection dans des PBL humains CD8 $^{+}$ transduits par le vecteur pTG6327 (Δ) puis infectés par le virus VIH III B, comparée aux cellules non transduites (\blacklozenge).

EXEMPLES

10

Toutes les opérations de clonage détaillées ci-après, sont effectuées selon les techniques classiques de biologie moléculaire (Maniatis et al., 1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Ces étapes sont réalisées dans la souche *Escherichia coli* (*E. coli*) 5K, XL1-Blue ou

15 1106.

20

Les gènes humains codant pour les IFNs α et β ont été clonés par PCR (Polymerase Chain Reaction) à partir de l'ADN génomique de cellules lymphoïdes, par exemple de cellules CEM-A3 (dérivées d'une lignée CEM disponible à l'ATCC sous le numéro CCL119). De telles banques sont disponibles dans le commerce. L'amplification de fragments d'ADN par PCR peut être effectuée à l'aide de kits commerciaux selon les spécifications du fabricant ou selon la technologie décrite dans PCR Protocols-A (edited by Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press Inc) à l'aide d'amorces complémentaires aux séquences publiées. Le gène humain codant pour l'IFN γ est obtenu du pTG11

25

décrit dans la demande de brevet français publiée sous le numéro 2.583.429. Des sites de restriction appropriés ont été introduits en amont et en aval de l'ATG initiateur et du codon stop des différents gènes IFN afin de pouvoir faciliter les étapes de clonage ultérieures. D'autre part, les sites de restriction protubérants en 5' peuvent être convertis en sites francs par traitement par le grand fragment Klenow de l'ADN polymerase d'*E. coli* alors que les sites protubérants en 3' sont traités par la T4 polymérase.

EXEMPLE 1 : Construction de vecteurs d'expression de l'interféron inductibles

- 10 -

par la protéine TAT du VIH et dans lesquels le gène de sélection est constitué par le gène puromycine.

5 *A. Vecteurs non viraux d'expression de l'IFN sous le contrôle du promoteur du VIH.*

On décrit la construction de vecteurs dans lesquels l'expression des gènes IFN α , 10 β , et γ est placée sous le contrôle du LTR 5' du VIH. Ces vecteurs ont été construits à partir du vecteur pTG1322 décrit dans Mehtali (1992, AIDS and Human Retroviruses, 8, 1959-1965) comprenant un gène hétérologue placé sous le contrôle du LTR 5' du VIH (fragment *Xba*I-*Hind*III de 725 pb correspondant aux positions -645 à +80 du génome VIH). Ce vecteur porte également l'intron et le signal de polyadénylation du virus SV40. Il est digéré par *Hind*III traité à la Klenow puis digéré par *Sma*I.

15 On introduit dans pTG1322 ainsi traité, le gène IFN α sous forme d'un fragment délimité par les sites *Sma*I et *Eco*RI traité à la Klenow et on génère pTG4313 (Figure 1). pTG4314 est obtenu par insertion du fragment *Sma*I-*Eco*RV portant le gène IFN β dans pTG1322 obtenu comme précédemment. On génère pTG4315 20 par insertion du gène IFN γ sous forme d'un fragment *Hpa*I-*Pvu*II entre les mêmes sites de pTG1322.

On introduit dans le site *Eco*RI de ces différents vecteurs d'expression d'un IFN, 25 un gène de sélection conférant la résistance à la puromycine (puromycine R) sous forme d'un fragment de 1,2 kb *Bam*HI-*Bgl*II traité à la Klenow. Ce fragment comporte le promoteur précoce du virus SV40, le gène puromycine R et le signal de polyadénylation de SV40. On obtient les vecteurs pTG4344 (représenté à la Figure 2), pTG4345 et pTG4346, qui permettent la co-expression du gène de sélection puromycine R et respectivement du gène IFN α , β ou γ .

30

B. Vecteur rétroviral pour le transfert et l'expression des gènes IFN.

Le vecteur à la base des constructions est le pLXSP qui dérive de pLXSN (Miller et Rossman, 1989, Biotechniques, 7, 980-988) après remplacement du gène de

- 11 -

sélection néomycine par le gène puromycine R et du LTR 3' de MSV (Myelo Sarcoma Virus) par le LTR 3' du MPSV (Myelo Proliferative Sarcoma Virus).

On isole du génome du VIH un fragment *Scal-Hind*III de 200 pb correspondant 5 au mini LTR (position -120 à +80), qui est ensuite introduit en amont de chacun des gènes IFNs. Puis on introduit en 3' des gènes, le signal de polyadénylation du SV40. Le vecteur ainsi obtenu est digéré par *Bg*II, traité à la Klenow. Le fragment comportant la cassette d'expression "mini LTR - IFN - signal de polyadénylation" est introduit entre les sites *Hpa*I-*Bg*II du vecteur rétroviral 10 pTG4056. On sélectionne les clones dans lesquels ce fragment est positionné en orientation réverse par rapport aux LTRs 5' et 3'. pTG4056 provient du pLXSP à la suite de la délétion du bloc d'expression promoteur SV40-puromycine R et la 15 réinsertion du gène puromycine R dans l'orientation correcte pour être placé sous le contrôle du LTR 5'.

15 On obtient les vecteurs rétroviraux pTG4392, pTG4391 et pTG4379 (Figure 3) permettant le transfert et l'expression des séquences codant respectivement pour les IFNs α , β et γ . Ils peuvent être transfectés dans une lignée cellulaire d'encapsidation amphotrope, par exemple la lignée PA317 (Miller et al., 1986, Mol. Cell. Biol. 6, 2895-2902), Gp Env. Am (Markowitz et al., 1988, Virology, 20 167, 400-406) ou PG13 (Miller et al., 1991, J. Virol. 65, 2220-2224). Le jour suivant, les cellules transfectées sont placées en milieu sélectif (puromycine 6 μ g/ml). On isole les cellules résistantes qui constitueront des lignées productrices 25 de particules amphotropes capables d'infecter les cellules humaines, à partir desquelles on peut constituer un stock viral susceptible d'être utilisé en thérapie génique anti SIDA.

C. Vecteurs régulables par TAT dans lesquels l'expression de l'IFN est dirigée par un promoteur eucaryote.

30

1. Promoteur PGK murin.

La séquence TAR (correspondant aux nucléotides +1 à +80 du génome du VIH) est générée par synthèse chimique. Puis, l'oligonucléotide double brin ainsi obtenu

- 12 -

est introduit par mutagénèse insertionnelle en position +1 du promoteur PGK murin, dont la séquence est publiée dans Adra et al. (1987, Gene, 60, 65-74). On insère en aval de la séquence TAR, le fragment comportant la séquence codant pour l'IFN humain α , β ou γ suivie du signal de polyadénylation de SV40.

5

Enfin, la cassette d'expression "promoteur PGK-TAR-IFN-polyA" est introduite dans le vecteur rétroviral pLXSP. Bien entendu à chaque séquence IFN α , β ou γ correspond un vecteur rétroviral. Comme précédemment, on établit une lignée d'encapsidation amphotrope productrice de chaque type de particules virales.

10

2. Promoteur β -actine murin.

L'exemple précédent est reproduit avec la variante suivante :

15

La séquence synthétique TAR est introduite en position +1 du promoteur β -actine de rat dont la séquence est décrite dans Nudel et al., (1983, Nucleic Acids Res., 11, 1759-1771)

20

EXEMPLE 2 : Construction de vecteurs d'expression d'un IFN humain inducibles par la protéine TAT du VIH et dans lesquels le gène de sélection est constitué par le gène néomycine et établissement de lignées amphotropes correspondantes.

25

En premier lieu, le mini LTR du VIH est isolé du génome viral après digestion *Sca*I - *Hind*III, inséré dans un plasmide quelconque pour être resorti sous forme d'un fragment *Sma*I-*Hind*III puis cloné entre les mêmes sites du vecteur pTG2359.

30

Ce dernier correspond au clonage du site de polyadénylation du virus SV40 dans le plasmide p Bluescript KS (Stratagène). On obtient pTG4347 dans lequel on introduit, après digestion par *Bal*I, un fragment *Sma*I-*Hpa*I portant les séquences codant pour l'IFN α .

Enfin, la cassette d'expression "mini LTR-IFN α -polyA SV40" est purifiée du

- 13 -

vecteur pTG4355 obtenu à l'étape précédente sous forme d'un fragment *Bam*HI-*Bg*II, qui est cloné dans le site *Bam*HI de pTG6320 pour donner pTG6324 (Figure 5). Ce dernier comprend donc le LTR du MSV dirigeant l'expression du gène de sélection *neo*, suivi de la cassette "mini LTR - IFN α - polyA SV40" positionnée en orientation réverse afin d'éviter les phénomènes d'interférence entre les promoteurs et enfin le LTR 3' rétroviral du MPSV. A titre indicatif, pTG6320 provient du pLXSP à la suite de la détérioration de la cassette d'expression du gène puromycine et remplacement par le gène néomycine (Colbère - Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol., 150, 1-14).

10

B. Construction du pTG6328 pour l'expression de l'IFN γ .

15

La stratégie de clonage est tout à fait similaire à ce qui est décrit ci-dessus. Le vecteur pTG6311 provient de l'insertion d'un fragment *Sma*I-*Hpa*I portant la séquence codant pour l'IFN γ dans le site *Bal*I du pTG4347. Puis, on obtient le vecteur rétroviral pTG6328 en clonant le fragment *Bam*HI-*Bg*II purifié du pTG6311 dans le vecteur pTG6320 préalablement digéré par *Bam*HI. Celui-ci est l'équivalent de pTG6324 à la différence qu'il porte le gène IFN γ à la place du gène IFN α .

20

C. Construction du vecteur rétroviral pTG6327 pour l'expression de l'IFN β .

25

Le fragment *Sma*I-*Hind*III portant le mini LTR VIH est inséré entre les mêmes sites de pTG4356, pour générer pTG6312. Le vecteur pTG4356 correspond au vecteur pTG2359 dans lequel on a cloné (site *Bal*I) le gène IFN β (fragment *Sma*I-*Eco*RV). Comme précédemment, la cassette d'expression de l'IFN β est purifiée de pTG6312 après digestion par *Bam*HI et *Bg*II puis sous-clonée dans le site *Bam*HI de pTG6320 pour donner pTG6327.

30

D. Etablissement de lignées amphotropes pour la production de particules virales infectieuses

On peut préparer des stocks de particules virales infectieuses à partir de chacun des vecteurs précédents pTG6324, pTG6327 et pTG6328. Pour ce faire, ces

derniers sont transfectés de manière classique dans une lignée d'encapsidation ecotope, par exemple la lignée GP + E 86 (Markowitz et al., 1988, J. Virol., 62, 1120-1124). 48 h après la transfection, les cellules sont cultivées en milieu sélectif (G418 1 mg/ml).

5

Le mélange de clones résistants au G418 est maintenu pendant 3 jours supplémentaires en milieu sélectif. Le surnageant de culture est récolté pour infecter de façon conventionnelle, une lignée d'encapsidation amphotrope comme la lignée PA317. Après sélection, les lignées ainsi obtenues constitueront les cellules productrices de particules virales infectieuses permettant le transfert et l'expression des différents IFNs dans le cadre d'une thérapie génique humaine.

10 Leur capacité à produire un IFN actif peut être évaluée dans les surnageants de culture par la méthode décrite dans The Interferon System (W.E. Stewart, 1979, 15 Ed : Springer-Verlag Wien, New York). Ce test de fonctionnalité, lorsqu'il est effectué sur les cellules générées à l'étape précédente, donne un niveau faible d'IFN dans les trois cas. Par contre, lorsque les cellules sont transfectées de manière transitoire par le plasmide pHMG-TAT, le niveau mesuré est élevé et atteint quelques centaines d'unité par ml. pHMG-TAT est un vecteur d'expression 20 de la protéine TAT native et résulte du clonage de la séquence codant pour celle-ci dans le vecteur pHMG (Mehtali et al., 1990, Gene, 91, 179-184).

25 Par ailleurs, il peut être intéressant d'isoler des clones producteurs. Ceci est réalisé classiquement par la technique de dilution clonale (0,3 cellule par puit). On sélectionne un clone bon producteur de virions titrant 5×10^6 à 10^7 ufp/ml après infection des cellules murines NIH-3T3 (ATCC CRL 1658) par une aliquote de surnageant de culture du clone. On vérifie sa capacité à produire de l'IFN comme indiqué précédemment. On effectue à nouveau une dilution clonale à partir des clones précédents afin de générer des sous-clones. On sélectionne pour chacun 30 d'entre eux un sous clone bon producteur de virions et d'IFN après titration et dosage de l'IFN.

Les sous-clones sont congelés avant utilisation dans un but de thérapie génique.

- 15 -

EXEMPLE 3 : Construction de vecteurs d'expression d'un IFN humain inductibles par la protéine REV du VIH.

On décrit un vecteur rétroviral par insertion dans le vecteur pLXSP et dans 5 l'orientation réverse par rapport aux LTRs, d'une cassette d'expression comprenant de 5' vers 3' :

- le promoteur du virus SV40 ;
- la séquence d'ADN codant pour l'IFN humain α , β ou γ ;
- 10 - la séquence RRE/CRS. Cette dernière est isolée du génome du VIH-1 isolat Lai sous forme d'un fragment *Bg*II-*Bam*HI (s'étendant des nucléotides 7178 à 8032 de la séquence telle que publiée par Wain-Hobson et al., *supra*). Ce fragment peut être traité par la Klenow avant d'être introduit dans un site de restriction adéquat ; et
- 15 - le signal de polyadénylation de SV40.

Comme précédemment, on peut constituer des stocks viraux après transfection dans une lignée d'encapsidation amphotrope.

20 EXEMPLE 4 : Construction de vecteurs d'expression d'un IFN humain inductibles par les protéines TAT et REV du VIH.

On insère dans les vecteurs pTG4392, pTG4391 et pTG4379 le fragment *Bam*HI-*Bg*II traité à la Klenow et porteur de la séquence RRE/CRS du VIH entre la 25 séquence codant pour un des IFNs et le signal de polyadénylation de SV40.

De plus, les vecteurs ainsi obtenus peuvent être modifiés par l'insertion d'un site donneur d'épissage entre le LTR du VIH et le gène IFN.

30 Comme précédemment, on peut générer une lignée amphotrope productrice de particules infectieuses correspondant à chacun des vecteurs ainsi obtenus.

EXEMPLE 5 : Résistance à l'infection virale des lignées cellulaires transfectées par les vecteurs d'expression de l'IFN inductibles par TAT.

Les expérimentations ci-après décrites sont effectuées dans des lignées cellulaires naturellement infectables par le VIH, comme :

5 - la lignée U937 (ATCC CRL1593) dérivée de monocytes humains ; et
- la lignée CEM-A3 dérivée de cellules lymphocytaires humaines CD4+ (ATCC CCL119).

10 En pratique, les cellules sont cultivées selon les recommandations du fournisseur et transfectées par électroporation d'au moins 20 µg d'ADN à l'aide d'un appareillage approprié (Gene Pulser Biorad, voltage 210V, capacitance 960µF).

15 Dans une première expérience, on co-électropore dans les cellules U937 (2×10^7 cellules) le pTG4314 avec le vecteur pLXSP dans un rapport de concentration en ADN 20:1. Les cellules sont remises en culture à 37°C en présence de 5 % de CO₂, et le jour suivant, placées en milieu sélectif (puromycine 0,5 µg/ml). On sélectionne les cellules résistantes à l'antibiotique.

20 25 On teste leur résistance à l'infection en les infectant par une préparation de VIH à une TCID₅₀ élevée (au moins 1000). La TCID₅₀ est déterminée selon la méthode décrite dans Reed et al., (1938, Am. J. Hyg., 27, 493-497), sur lignées cellulaires infectables par le VIH, comme les cellules CEM. Elle correspond à la dose à laquelle 50 % des cellules sont infectées et 50 % ne le sont pas. Elle est vérifiée pour chaque lot de VIH employé.

30 Pour ce faire, on prélève une fraction de la culture cellulaire U937 électroporée, correspondant à environ 10^6 cellules, que l'on centrifuge à basse vitesse. Après lavage, le culot cellulaire est repris dans 200 µl de milieu de culture en absence de sérum. Puis les cellules sont traitées par différentes dilutions de la préparation virale. On laisse l'infection se poursuivre 1 heure à 37°C.

35 Les cellules sont ensuite lavées 2 fois dans du milieu de culture et mises en culture dans 5 ml du même milieu, complémenté avec 10 % de SVF (sérum de veau foetal). Le milieu est renouvelé 2 ou 3 fois par semaine. La propagation du virus est évaluée par mesure de l'activité réverse-transcriptase à intervalles réguliers

- 17 -

dans le surnageant de culture selon la méthode décrite dans Spire et al. (1985, Lancet, i, 188-189).

On observe une diminution significative (jusqu'à 85 %) de l'activité réverse-transcriptase sur 14 jours post-infection par rapport aux cellules U937 témoin non électroporée avec un vecteur d'expression de l'interféron.

10 L'expérience est répétée cette fois avec des cellules U937 initialement électroporées avec le pTG4344, pTG4345 ou pTG4346. Dans les trois cas, on observe une diminution encore supérieure de l'activité réverse-transcriptase sur 21 jours post-infection par rapport au témoin cellules non électroporées. (Figure 4).

EXEMPLE 6 : Mécanisme moléculaire de la résistance à l'infection VIH.

15 L'analyse est effectuée sur les cellules U937 électroporée et infectée *in vitro* par le VIH (exemple 5).

20 On recherche tout d'abord la présence du génome du VIH dans une préparation d'ADN génomique cellulaire. Ceci est réalisé par PCR à l'aide d'amorces adéquates permettant l'amplification d'un fragment du gène *gag* viral. La présence d'une bande d'amplification de taille attendue indique que l'expression de l'IFN n'interfère pas avec l'intégration du génome du VIH sous forme provirale dans les chromosomes cellulaires.

25 Il a également été possible de détecter la présence des ARNm codant pour les produits du gène *gag* par la technique de reverse-transcription PCR (mêmes amorces que précédemment). Ceci laisse supposer que l'expression de l'IFN n'a pas d'effet notable sur la transcription des séquences provirales.

30 Enfin, on évalue la présence et la localisation de la protéine virale gp120 par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-gp120 (obtenu de sérum de patients séropositifs). On constate que dans les cellules exprimant l'IFN, la protéine gp120 est sous forme intracellulaire, alors qu'elle devrait être sous-membranaire, afin de permettre le bourgeonnement des particules virales.

- 18 -

Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que l'IFN agit au niveau des étapes tardives du cycle viral et probablement au niveau de l'assemblage des virions.

EXEMPLE 7 : Méthode de traitement du SIDA par thérapie génique.

5

Dans le cadre d'une thérapie génique appliquée à l'homme, deux types de cellules cibles peuvent être envisagés :

10

- les lymphocytes CD4+ du sang périphérique qui peuvent être collectés notamment par leucophérèse, et
- les cellules souches hématopoïétiques CD34+ qui peuvent être obtenues d'un prélèvement de moëlle osseuse ou du sang périphérique (mobilisation par chimiothérapie ou par action de facteurs de croissance hématopoïétiques).

15

A. Protocole applicable aux cellules CD4+

20

Le patient est soumis à un prélèvement de sang ou à une leucophérèse. Après avoir éliminé les globules rouges, les cellules mononucléées sont isolées par centrifugation sur Ficoll et cultivées selon les techniques de l'art. Dans un premier temps, on se débarrasse des cellules adhérentes au plastique des flasques de culture. La suspension cellulaire est récupérée et cultivée dans des flasques revêtues d'anticorps anti-CD8 (Immunotech) afin d'éliminer les cellules CD8+. La suspension cellulaire ainsi obtenue est composée majoritairement de lymphocytes CD4+. Bien entendu, les autres techniques d'enrichissement peuvent également être employées.

25

Ceux-ci sont stimulés dans le but d'induire la division cellulaire avant d'effectuer la transduction rétrovirale. Les facteurs de croissance pouvant être mis en oeuvre à cet effet sont variés. A titre indicatif, on peut citer un mélange d'anticorps anti CD3 humain (Immunotech, environ 10 ng/ml) et d'IL-2 (Cetus ; 100 U/ml) ou encore de PHA (phytohemagglutidine, Sigma, à une concentration d'environ 5 µg/ml) et d'IL-2.

Après 72 heures de culture dans ces conditions, les cellules sont transduites par le vecteur rétroviral. Différentes méthodologies sont applicables :

35

- co-culture des cellules CD4+ et des cellules productrices amphotropes des

- 19 -

exemples 1 à 4.

- co-culture des 2 types cellulaires, les cellules CD4+ étant déposées dans les puits de culture et les cellules productrices dans un Transwell (Costar)

5

- infection des cellules CD4+ avec une aliquote de surnageant de culture des cellules productrices selon une m.o.i. (multiplicité d'infection) de préférence comprise entre 1 et 5.

10 Généralement la transduction est réalisée en présence de sulfate de protamine (à une concentration d'environ 5 µg/ml) pour favoriser l'attachement du virus à la surface cellulaire.

15 Le jour suivant, la culture cellulaire est passée en milieu sélectif (puromycine dans le cadre des vecteurs de l'exemple 1 ou G418 dans le cadre des vecteurs de l'exemple 2) et poursuivie pendant 7 à 8 jours jusqu'à obtenir le nombre de cellules appropriées. On indique qu'il peut être avantageux d'employer le milieu AIM V (Gibco BRL) complémenté par de la L-glutamine (2 mM) et de l'IL-2 (100 U/ml) et dépourvu de sérum.

20

La capacité de ces cellules à inhiber la réplication du VIH est testée *in vitro*. Elles sont infectées par le VIH-1 IIIB à une m.o.i. de 10^{-2} selon la méthodologie classique dans le domaine de l'art. Après lavage et remise en culture, la propagation du virus est évaluée par mesure de l'activité réverse-transcriptase dans le surnageant de culture (Figure 6). Celle-ci se situe à un niveau très bas pendant au moins 20 jours de culture. A titre comparatif, dans le cas des cellules non transduites, l'activité réverse-transcriptase augmente très fortement jusqu'à atteindre un maximum dès le troisième jour de culture et est rapidement suivie de la mort cellulaire.

30 *B. Protocole applicable aux cellules CD34+.*

Les étapes de la purification des cellules CD34 sont les suivantes :

- isolement des cellules mononucléées du prélèvement de sang périphérique ou de 35 moëlle osseuse par centrifugation Ficoll,

- 20 -

- déplétion des cellules adhérentes, et
- capture des cellules CD34+ par culture dans des flasques recouvertes d'anticorps anti-CD34 (Immunotech) ou en présence de billes revêtues de cet anticorps. On élimine les cellules en suspension et on récupère les cellules adhérentes après 5 action, par exemple, de papaine.

10 Comme précédemment, les cellules CD34+ ainsi obtenues sont stimulées par divers facteurs de croissance pour les placer en cycle de division et ainsi favoriser l'infection rétrovirale. On peut utiliser à cet effet un mélange d'IL-3 (environ 10 ng/ml), d'IL-6 (à environ 50 U/ml) et de SCF (Stem cell factor, environ 50 U/ml) incorporé dans le milieu de culture pendant 48 heures avant d'effectuer la transduction selon le protocole indiqué précédemment. Ces facteurs sont disponibles commercialement. Les cellules sont ensuite réadministrées au patient.

Revendications

1. Une cassette comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour un IFN humain placée sous le contrôle des éléments capables d'assurer son expression dans une cellule de mammifère, caractérisée en ce que lesdits éléments sont régulables par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).
5
2. Une cassette selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'IFN est sélectionné parmi les IFNs humains de type α , β et γ .
10
3. Une cassette selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les éléments capables d'assurer l'expression dans une cellule mammifère comprennent au moins un promoteur et une séquence de type TAR et/ou RRE/CRS.
15
4. Une cassette selon la revendication 3, caractérisée en ce que la séquence de type TAR est placée en 3' dudit promoteur.
20
5. Une cassette selon la revendication 3 ou 4, caractérisée en ce que la séquence de type RRE/CRS est placée en 3' de la séquence d'ADN codant pour un IFN humain.
25
6. Une cassette selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le promoteur fonctionnel dans une cellule de mammifère est sélectionné parmi les promoteurs des gènes murins PGK et -actine, le LTR 5' du VIH et un fragment de celui ci (mini LTR).
30
7. Une cassette selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce que lesdits éléments comportent en outre un site donneur d'épissage.
35
8. Une cassette selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce que lesdits éléments comprennent en outre un signal de polyadénylation.
9. Un vecteur comprenant une cassette selon l'une des revendications 1 à 8.
10. Un vecteur selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur rétroviral.

- 22 -

11. Un vecteur selon la revendication 10, caractérisé en ce que la cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 8 est positionnée en orientation réverse par rapport aux LTRs dudit vecteur.
5
12. Un vecteur selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un gène de sélection.
13. Un vecteur selon la revendication 12, caractérisé en ce que le gène de sélection confère la résistance à la puromycine ou la néomycine.
10
14. Une cellule eucaryote comprenant une cassette selon l'une des revendications 1 à 8 ou un vecteur selon l'une des revendications 9 à 13.
15. 15. Une cellule selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine de la lignée hématopoïétique.
15
16. Usage d'une cassette selon l'une des revendications 1 à 8, d'un vecteur selon l'une des revendications 9 à 13 ou d'une cellule selon la revendication 14 ou 15, pour 20 la fabrication d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement des infections virales.
17. Usage selon la revendication 16, destiné à la prévention ou au traitement des infections dues au VIH.
25
18. Une composition pharmaceutique comprenant une quantité thérapeutiquement efficace d'une cassette selon l'une des revendications 1 à 8, d'un vecteur selon l'une des revendications 9 à 13 ou d'une cellule selon la revendication 14 ou 15, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
30
19. Une composition pharmaceutique selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle comprend de 10^3 à 10^{14} pfu d'un vecteur selon l'une des revendications 9 à 13.
- 35 20. Usage d'au moins deux cassettes selon l'une des revendications 1 à 8, vecteurs selon l'une des revendications 9 à 13 ou cellules selon la revendication 14 ou 15 exprimant chacun un IFN de type différent, pour une utilisation simultanée,

- 23 -

séparée ou étalée dans le temps et destinée à la prévention ou au traitement des infections virales et, notamment, des infections dues au VIH.

REVENDICATIONS MODIFIEES

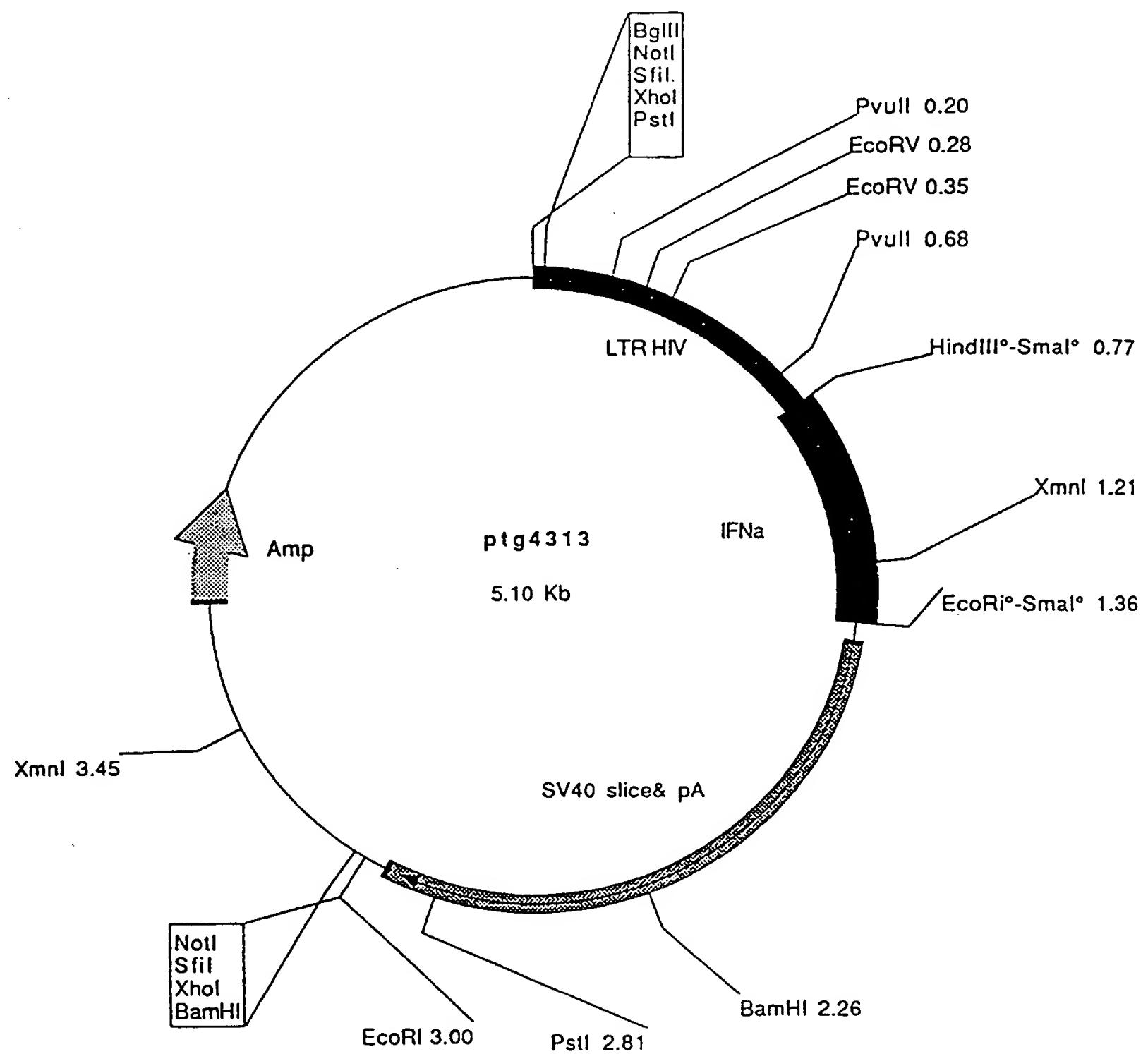
[reçues par le Bureau International le 28 avril 1995 (28.04.95); revendications 1-20 remplacées par les revendications 1-19 modifiées (3 pages)]

1. Une cassette comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour un IFN humain placée sous le contrôle des éléments capables d'assurer son expression dans une cellule de mammifère, caractérisée en ce que lesdits éléments comprennent au moins un promoteur et une séquence de type TAR et/ou RRE/CRS et sont régulables par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).
2. Une cassette selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'IFN est sélectionné parmi les IFNs humains de type α , β et γ .
3. Une cassette selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que la séquence de type TAR est placée en 3' dudit promoteur.
4. Une cassette selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la séquence de type RRE/CRS est placée en 3' de la séquence d'ADN codant pour un IFN humain.
5. Une cassette selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le promoteur fonctionnel dans une cellule de mammifère est sélectionné parmi les promoteurs des gènes murins PGK et β -actine, le LTR 5' du VIH et un fragment de celui-ci (mini LTR).
6. Une cassette selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que lesdits éléments comportent en outre un site donneur d'épissage.
7. Une cassette selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que lesdits éléments comprennent en outre un signal de polyadénylation.
8. Un vecteur comprenant une cassette selon l'une des revendications 1 à 7.
9. Un vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur rétroviral.

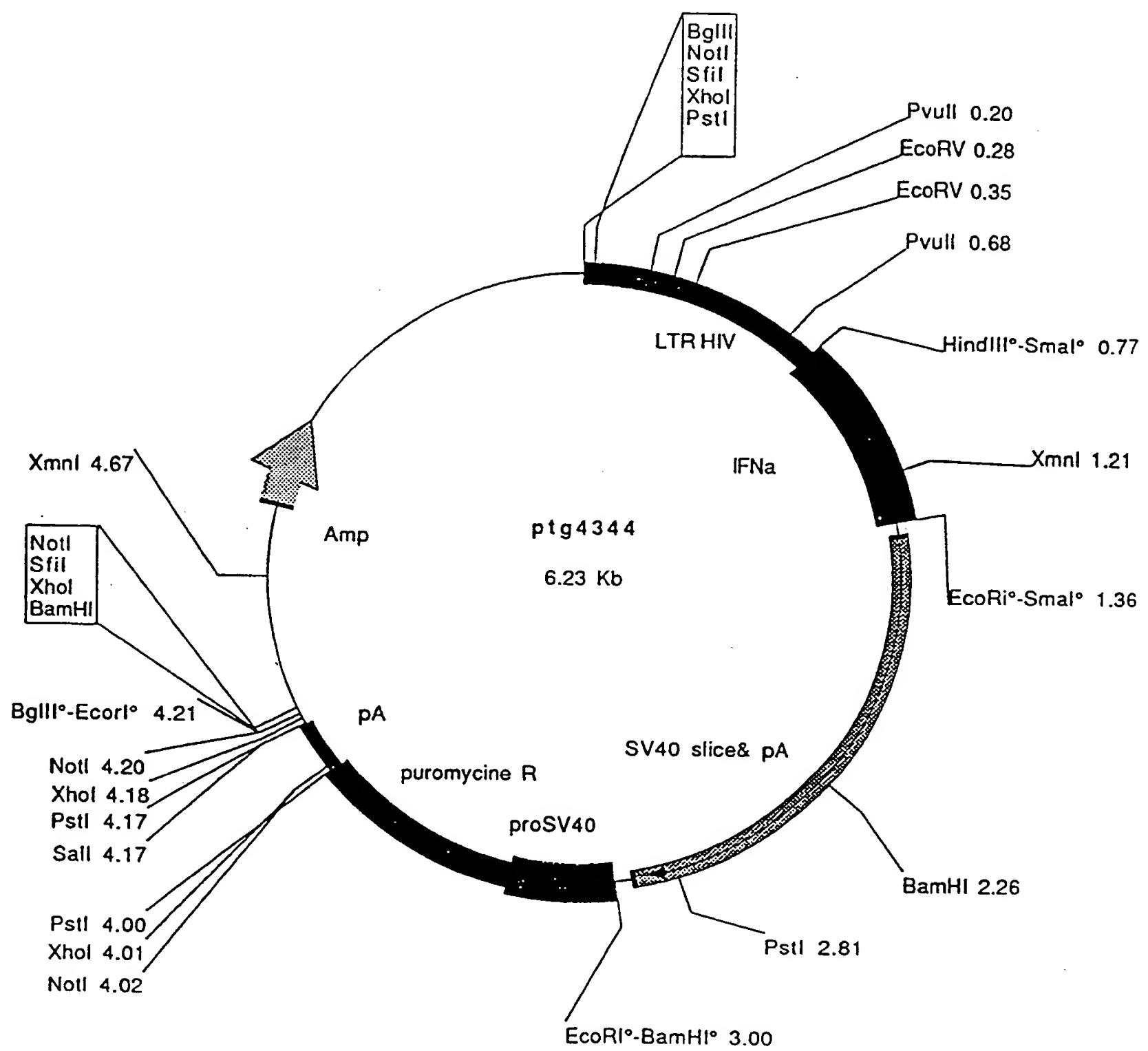
10. Un vecteur selon la revendication 9, caractérisé en ce que la cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 7 est positionnée en orientation réverse par rapport aux LTRs dudit vecteur.
11. Un vecteur selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un gène de sélection.
12. Un vecteur selon la revendication 11, caractérisé en ce que le gène de sélection confère la résistance à la puromycine.
13. Une cellule eucaryote comprenant une cassette selon l'une des revendications 1 à 7 ou un vecteur selon l'une des revendications 8 à 12.
14. Une cellule selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine de la lignée hématopoïétique.
15. Usage d'une cassette selon l'une des revendications 1 à 7, d'un vecteur selon l'une des revendications 8 à 12 ou d'une cellule selon l'une des revendications 13 ou 14, pour la fabrication d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement des infections dues au VIH.
16. Une composition pharmaceutique comprenant une quantité thérapeutiquement efficace d'une cassette selon l'une des revendications 1 à 7, d'un vecteur selon l'une des revendications 8 à 12 ou d'une cellule selon l'une des revendications 13 ou 14, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
17. Une composition pharmaceutique selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle comprend de 10^3 à 10^{13} pfu d'un vecteur selon l'une des revendications 8 à 12.
18. Produit contenant au moins deux cassettes selon l'une des revendications 1 à 7, vecteurs selon l'une des revendications 8 à 12 ou cellules selon l'une des revendications 13 ou 14 exprimant chacun un IFN de type différent, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps dans la prévention ou le traitement des infections dues au VIH.

19. Utilisation d'au moins deux cassettes selon l'une des revendications 1 à 7, vecteurs selon l'une des revendications 8 à 12 ou cellules selon l'une des revendications 13 ou 14 exprimant chacun un IFN de type différent, en utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, destinés à l'obtention d'un médicament pour la prévention ou le traitement des infections dues au VIH.

1 / 6



- Figure 1 -



- Figure 2 -

3 / 6

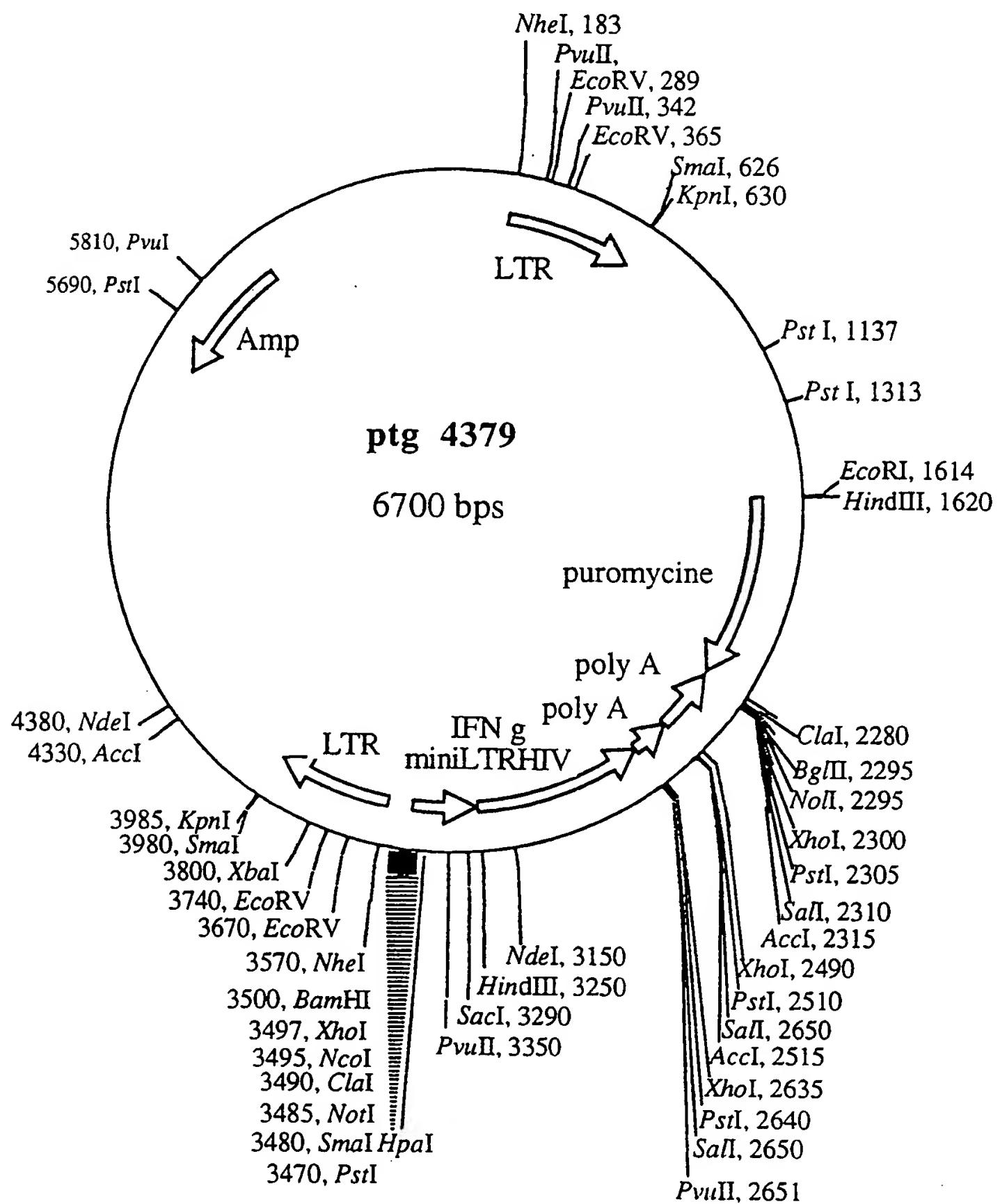
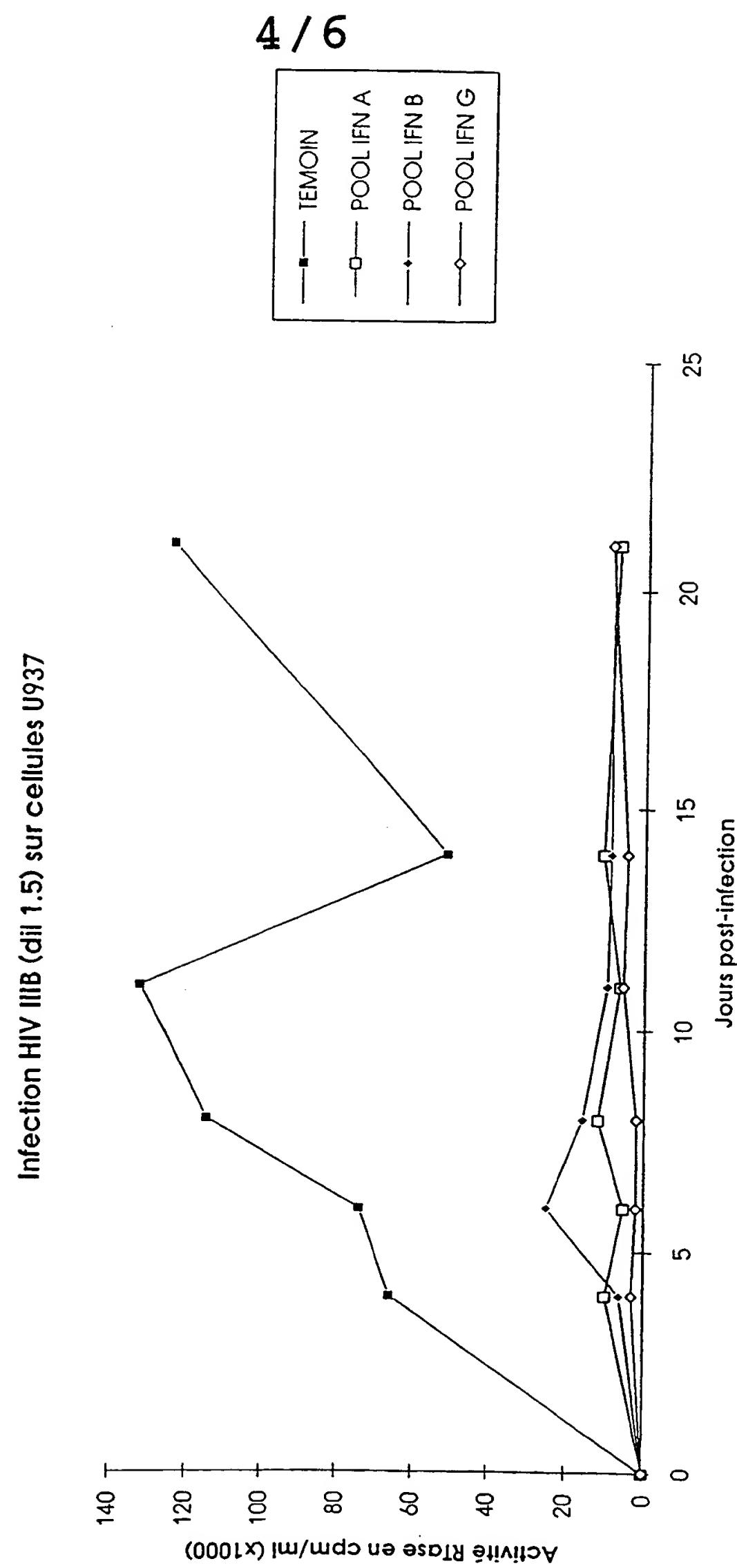


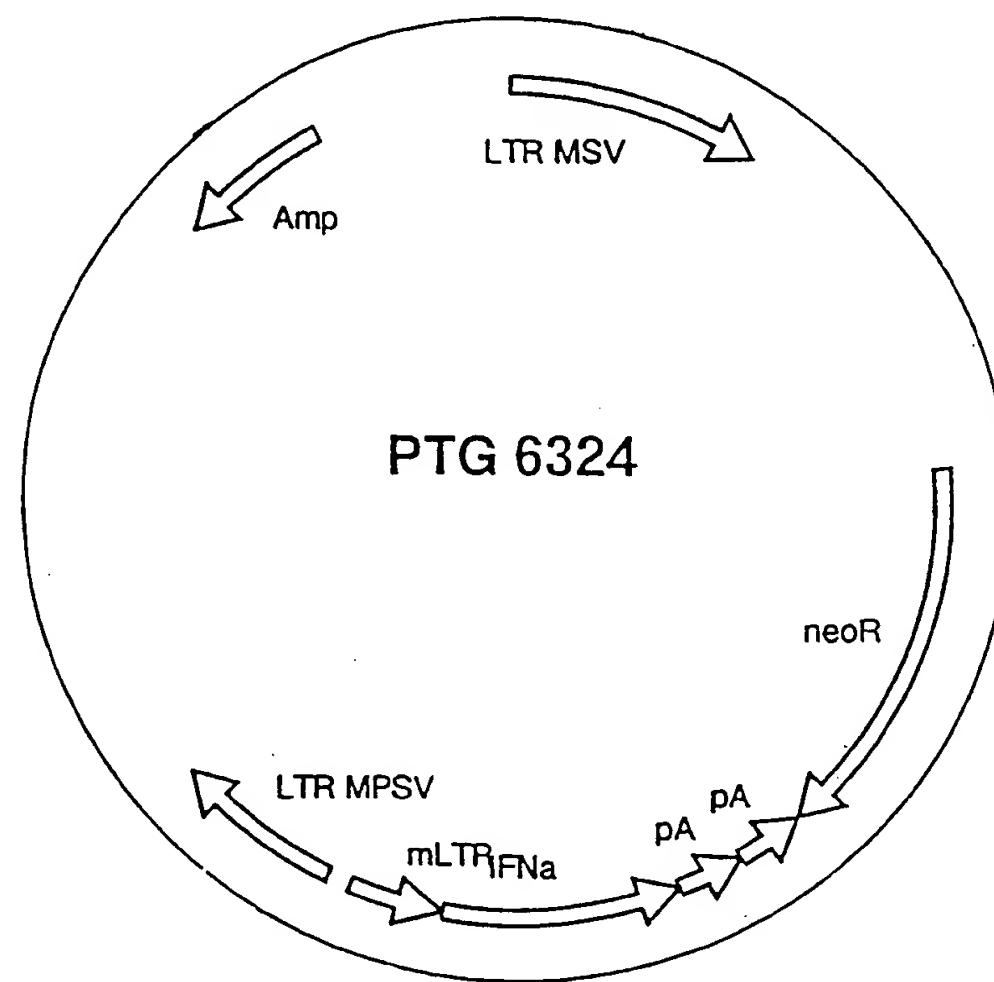
FIG. 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



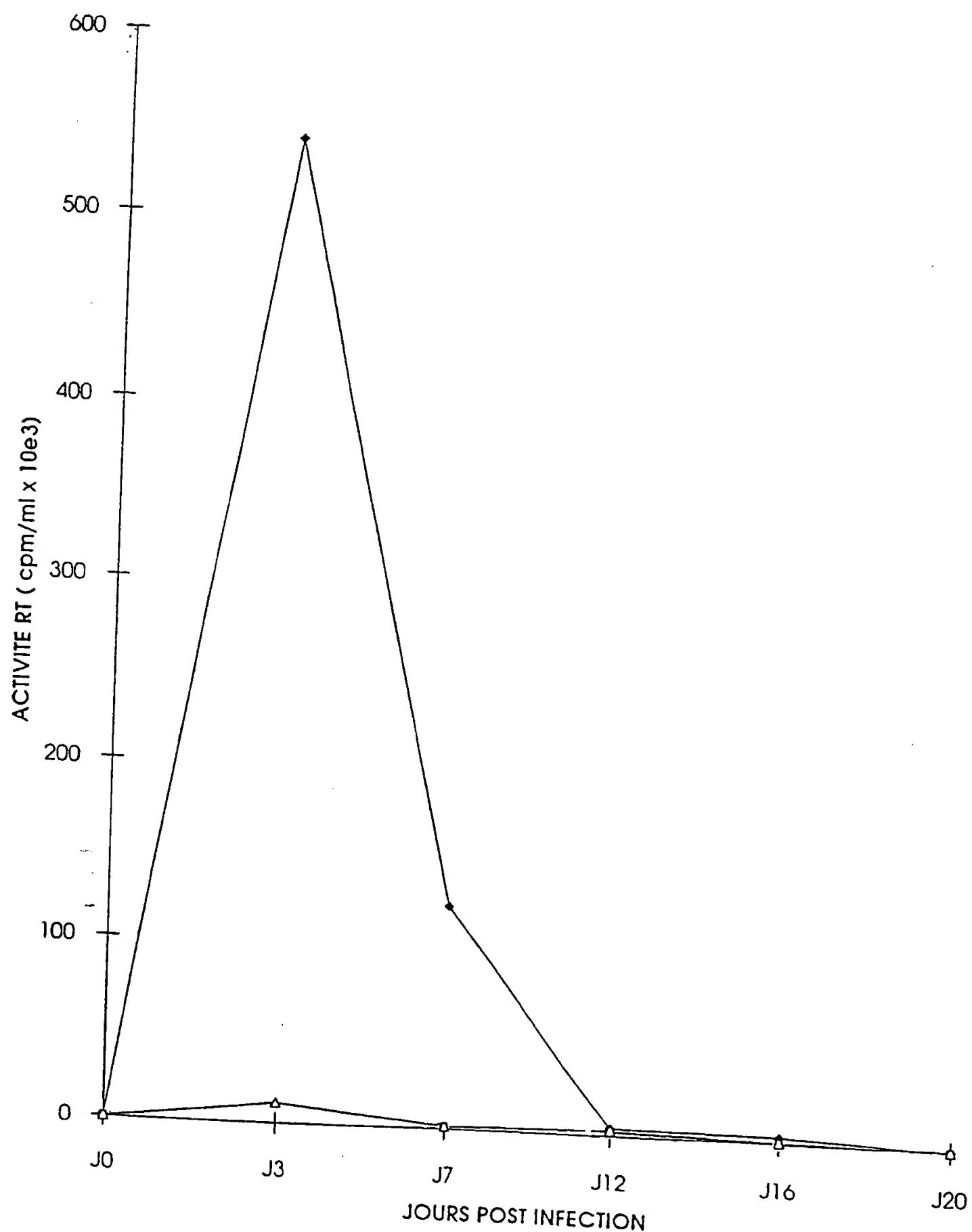
- Figure 4 -

5 / 6



- Figure 5 -

6 / 6



- Figure 6 -

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 94/01458

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C07K C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY SUPPL 0 , 17 PART E, 1993 page 202 R. A. MORGAN ET AL 'Progress toward gene therapy for AIDS : Choices for clinical applications' & KEYSTONE SYMPOSIUM ON GENETICALLY TARGETED RESEARCH AND THERAPEUTICS : ANTISENSE AND GENE THERAPY , April 1993, KEYSTONE, COLORADO, USA abstract n° S208 ---	1,2,8,9, 15,16
Y	R. A. MORGAN ET AL 'Progress toward gene therapy for AIDS : Choices for clinical applications' & KEYSTONE SYMPOSIUM ON GENETICALLY TARGETED RESEARCH AND THERAPEUTICS : ANTISENSE AND GENE THERAPY , April 1993, KEYSTONE, COLORADO, USA abstract n° S208 ---	3,7,8 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

28.02.95

9 February 1995

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 94/01458

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol.8, no.12, December 1992 pages 1959 - 1965</p> <p>M. MEHTALI ET AL 'A novel transgenic mouse model for the In Vivo evaluation of an Anti-human immunodeficiency virus type 1 drugs' cited in the application see page 1961; figure 2</p> <p>---</p>	3,7,8
Y	<p>SOMATIC CELL AND MOLECULAR GENETICS, vol.16, no.1, 1990 pages 1 - 14</p> <p>I. M. SHAPIRO ET AL 'Autonomous growth of lymphoid cells following IL-2 expression from Retrovirus vectors containing HIV-1 Trans-acting elements' see the whole document</p> <p>---</p>	3,7,8
X	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol.86, July 1989, WASHINGTON US pages 4958 - 4962</p> <p>D.P. BEDNARIK ET AL 'Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) replication by HIV-transactivated alpha2-interferon' see page 4958, left column, line 26 - line 31 see figure 1 see page 4961, left column</p> <p>---</p>	1,2,9, 10,16,20
A	<p>WO,A,93 07906 (SAN DIEGO REGIONAL CANCER CENTER) 29 April 1993 see page 25; claims; table 2</p> <p>---</p>	1
Y	<p>WO,A,90 11359 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 4 October 1990 see claims; figure 1 see abstract</p> <p>---</p>	3,7,8
Y	<p>NATURE, vol.334, no.14, July 1988, LONDON GB S. FENG ET AL 'HIV-1 TAT Trans-activation requires the loop sequence within TAR' see the whole document</p> <p>---</p>	3,7,8
A	<p>EP,A,0 266 940 (SCHERING CORPORATION) 11 May 1988</p> <p>-----</p>	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 94/01458

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9307906	29-04-93	CA-A-	2121127	29-04-93
WO-A-9011359	04-10-90	NONE		
EP-A-0266940	11-05-88	CA-A-	1297788	24-03-92
		DE-A-	3783122	28-01-93
		ES-T-	2052579	16-07-94
		JP-A-	63104929	10-05-88
		OA-A-	8768	31-03-89

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 94/01458A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/20

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY SUPPL 0 , 17 PART E, 1993 page 202 R. A. MORGAN ET AL 'Progress toward gene therapy for AIDS : Choices for clinical applications' Y & KEYSTNE SYMPOSIUM ON GENETICALLY TARGETED RESEARCH AND THERAPEUTICS : ANTISENSE AND GENE THERAPY , Avril 1993, KEYSTONE, COLORADO, USA * resumé no S208 *	1,2,8,9, 15,16
	---	3,7,8

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

1 Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

9 Février 1995

28.02.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Cornec, N

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol.8, no.12, Décembre 1992 pages 1959 - 1965</p> <p>M. MEHTALI ET AL 'A novel transgenic mouse model for the In Vivo evaluation of an Anti-human immunodeficiency virus type 1 drugs'</p> <p>cité dans la demande voir page 1961; figure 2</p> <p>---</p>	3,7,8
Y	<p>SOMATIC CELL AND MOLECULAR GENETICS, vol.16, no.1, 1990 pages 1 - 14</p> <p>I. M. SHAPIRO ET AL 'Autonomous growth of lymphoid cells following IL-2 expression from Retrovirus vectors containing HIV-1 Trans-acting elements'</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p>	3,7,8
X	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol.86, Juillet 1989, WASHINGTON US pages 4958 - 4962</p> <p>D.P. BEDNARIK ET AL 'Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) replication by HIV-transactivated alpha2-interferon'</p> <p>voir page 4958, colonne de gauche, ligne 26 - ligne 31</p> <p>voir figure 1</p> <p>voir page 4961, colonne de gauche</p> <p>---</p>	1,2,9, 10,16,20
A	<p>WO,A,93 07906 (SAN DIEGO REGIONAL CANCER CENTER) 29 Avril 1993</p> <p>voir page 25; revendications; tableau 2</p> <p>---</p>	1
Y	<p>WO,A,90 11359 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 4 Octobre 1990</p> <p>voir revendications; figure 1</p> <p>voir abrégé</p> <p>---</p>	3,7,8
Y	<p>NATURE, vol.334, no.14, Juillet 1988, LONDON GB</p> <p>S. FENG ET AL 'HIV-1 TAT Trans-activation requires the loop sequence within TAR'</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p>	3,7,8
A	<p>EP,A,0 266 940 (SCHERING CORPORATION) 11 Mai 1988</p> <p>-----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 94/01458

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9307906	29-04-93	CA-A-	2121127	29-04-93
WO-A-9011359	04-10-90	AUCUN		
EP-A-0266940	11-05-88	CA-A- DE-A- ES-T- JP-A- OA-A-	1297788 3783122 2052579 63104929 8768	24-03-92 28-01-93 16-07-94 10-05-88 31-03-89